



RECOR

07/369686

#2  
7-26-89

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER

1775 K STREET, N. W.

WASHINGTON, D. C. 20006

(202) 293-6850

TELEX

ITT 440275 FHFG  
RCA 248740 FHFG

FACSIMILE

GROUPS I, II, III (202) 887-5452

GROUPS I, II, III (202) 331-8499

RAPICOM (202) 785-3460

June 21, 1989

ATTORNEY DOCKET NO. HOAG-790

Honorable Commissioner of Patents  
and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

New U.S. Patent Application for  
MINI-PROINSULIN, ITS PREPARATION AND USE

Inventor(s): MICHAEL DORSCHUG, PAUL HABERMANN, GERHARD SEIPKE  
EUGEN UHLMANN

Sir:

We enclose the following papers for filing in the United States Patent and Trademark Office in connection with the above patent application.

ENCLOSURES

1. Declaration and Power of Attorney.
2. Application-TWENTY-EIGHT (28) pages, including 8 independent claim(s) and 10 claims total.
3. Assignment from the above referenced inventor(s) to HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT.
4. Certified copy of German Application No(s). P 38 21 159.9 filed June 23, 1988.
5. SIX (6) sheets of FORMAL drawings.
6. Check in the amount of \$558.00. This represents a \$550.00 filing fee and a \$8.00 assignment recording fee.

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW, GARRETT & DUNNER

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional filing fees due to Deposit Account No. 06-0916.

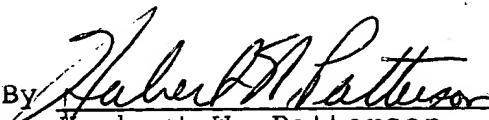
The Commissioner is hereby authorized to charge any other fees due under 37 C.F.R. § 1.16 or § 1.17 during the pendency of this application to our Deposit Account No. 06-916.

Applicant(s) claim(s) the right to priority based on German Application No(s). P 38 21 159.9 filed June 23, 1988.

Please accord this application a serial number and filing date.

Very truly yours,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,  
GARRETT & DUNNER

By   
Herbert W. Patterson  
Reg. No. 19,000

Enclosures  
HOAG-790



## **Bescheinigung**

Die HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT in 6230 Frankfurt hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mini-Proinsulin, seine Herstellung und Verwendung"

am 23. Juni 1988 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die angeheftete Zusammenfassung, die der Anmeldung beizufügen, aber kein Bestandteil der Anmeldung ist, stimmt mit dem am 23. Juni 1988 eingereichten Original überein.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 12 N 1/20, C 12 N 1/16, C 12 N 15/00, C 12 P 19/34, C 07 H 21/04, C 12 P 21/02, C 07 K 7/10, C 07 K 15/04 und A 61 K 37/02 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 28. September 1988

**Der Präsident des Deutschen Patentamts**

Im Auftrag

A handwritten signature in blue ink.

**R. Konvalin**

Aktenzeichen: P 38 21 159.9

Beschreibung

**Mini-Proinsulin, seine Herstellung und Verwendung**

Die Erfindung betrifft ein neues "Mini-Proinsulin", bei dem die unverkürzte B-Kette nur über einen Argininrest an die A-Kette gebunden ist. Aus diesem Mini-Proinsulin ist Humaninsulin ohne aufwendige chemische Umsetzung zugänglich.

Mini-Proinsuline mit einer verkürzten C-Kette sind bekannt. So haben R. Wetzel et al., Gene 16 (1981), 63 - 71, ein Proinsulin mit einer auf sechs Aminosäuren verkürzten C-Kette beschrieben. Aus der europäischen Patentanmeldung mit der Publikationsnummer (EP-A) 0 055 945 sind entsprechende Proinsuline bekannt, deren C-Kette bis auf zwei Aminosäuren verkürzt ist.

15 Aus der EP-A 0 163 529 sind Insulinvorläufer mit einer verkürzten B-Kette bekannt, bei denen die C-Kette entweder ganz entfällt oder aber - bis auf eine Aminosäure - verkürzt ist. Diese Vorprodukte werden durch 20 Trypsinkatalysierte Transpeptidierung mit einem  $\alpha$ -Threoninester in reifes Humaninsulin überführt.

Demgegenüber betrifft die Erfindung das Human-Des-(32-65)-Proinsulin oder Mini-Proinsulin der Formel I

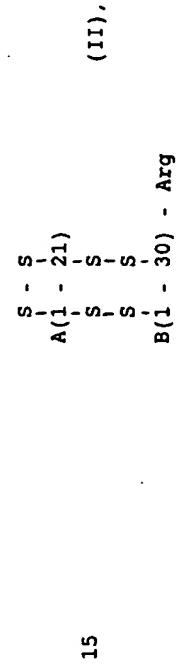
25 B(1-30)-Arg-A(1-21) (I),

in der B(1-30) und A(1-21) die B- bzw. A-Kette des Humaninsulins bedeuten. Diese Verbindung dient nicht nur als Zwischenprodukt zur Herstellung von Human-Insulin-ArgB31-OH, im folgenden "Mono-Arg-Insulin" genannt, das aus 30 den europäischen Patentschriften (EP-B) 0 132 769 und 0 132 770 bekannt ist, sowie von Humaninsulin, sondern sie

zeigt auch selbst eine gewisse Insulinaktivität.

Die Erfindung betrifft deshalb auch die Verbindung der Formel I zur Verwendung als Heilmittel, insbesondere zur Behandlung des Diabetes mellitus, und weiterhin 5 Arzneimittel, enthaltend die Verbindung der Formel I, sowie Arzneimittel aus einem pharmakologisch unbedenklichen Träger und der Verbindung der Formel I.

10 Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Verbindung der Formel I zur Herstellung des Mono-Arg-Insulins der Formel II



20 in der A(1-21) und B(1-30) die vorstehend genannten Bedeutungen haben und die -S-S-Brücken wie im Insulin angeordnet sind, und von Humaninsulin, durch enzymatische Spaltung. Besonders vorteilhaft ist die unmittelbare Überführung der Verbindung der Formel I in Insulin in einer "Eintopfreaktion".

25 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel I, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man ein für diese Verbindung codierendes Gen in einer Wirtszelle, vorzugsweise in einem Bakterium wie E. coli oder in einer Hefe, insbesondere *Saccharomyces cerevisiae*, exprimiert. Die Erfindung betrifft außerdem DNA-Sequenzen, die für die Verbindung der Formel I codieren, Genstrukturen oder Plasmide, die diese DNA enthalten, sowie Wirtszellen, insbesondere Bakterien wie E. coli- oder Hefezellen, vor allem Hefen der Art *Saccharomyces cerevisiae*, die solche 30 Genstrukturen oder Plasmide enthalten. Die Erfindung

35 bezieht sich weiterhin auf Fusionsproteine, die eine Verbindung der Formel I enthalten, vorzugsweise Fusionsproteine, in denen die Verbindung der Formel I über das Brückenglied

- Met - Gly - Arg -

an den "Ballastanteil" des Fusionsproteins gebunden ist.

10 Weitere bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung werden im folgenden näher erläutert.

Die Figuren dienen zur Erläuterung der Beispiele, wobei Fig. 1 (und deren Fortsetzung in Fig. 1a und 1b) die Konstruktion des E. coli-Expressionsvektors pIK10 und Fig. 2 (und deren Fortsetzung in Fig. 2 und 2b) die des Hefe-Expressionsvektors pafB102 bzw. pafB104 zeigt. Diese Vektoren codieren für Mini-Proinsulin.

15 Es wurde gefunden, daß das Mini-Proinsulin die korrekte Faltung aufweist, so daß nach Spaltung mit Trypsin fast quantitativ Mono-Arg-Insulin entsteht. Es ergibt sich also ein überraschend einfaches Verfahren zur Herstellung von Mono-Arg-Insulin. Aus diesem kann in an sich bekannter Weise Humaninsulin hergestellt werden. Weiterhin dient Mono-Arg-Insulin als Wirkstoff in Arzneimitteln (EP-B 0 132 769).

20 In der EP-A 0 229 998 wurde der Expressionsvektor pK50 beschrieben. Mini-Proinsulin kann in Form eines Fusionsproteins entsprechend dieser Konstruktion in einem Bakterium wie E. coli hergestellt werden.

Das schwerlösliche Fusionsprotein kann durch Waschen mit neutralen Pufferlösungen angereichert werden. Durch 25 Halogencyanospaltung (E. Gross und B. Wittkop, J. Am. Chem. Soc. 82 (1961) 1510 - 1517) wird das Mini-Proinsulin

freigesetzt. Dieses liegt noch nicht in der biologisch aktiven Form vor, sondern besteht aus einer uneinheitlichen Mischung mit verschiedenen inter- und intramolekularen Disulfidbrücken, eventuell auch mit anderen Proteinfragmenten. Als chemisch einheitliches, relativ stabiles Derivat stellt man die S-Sulfonat-Form des Moleküls her (P. G. Katsoyannis et al., *Biochemistry* 6 (1967) 2635 - 2641). Dieses Derivat lässt sich sehr gut durch Ionenaustausch-Chromatographie reinigen und ist ein bewährtes Ausgangsmaterial für die Faltung in die native Raumstruktur unter Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken (Y. C. Du et al., *Sci. Sin.* 15 (1965) 229 - 236; H. P. Gattner et al., *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* 362 (1981) 1943-1049; B. H. Frank et al. in: "Peptides: Synthesis, Structure-Function", D. H. Rich und E. Gross, Hrsg., (1981) 1043 - 1049). Der Erfolg dieser Faltung wird durch HPLC-Analyse der nach Spaltung mit *S. aureus*-Protease V8 entstehenden Fragmente abgesichert (U. Grau, *Diabetes* 34 (1985) 1174 - 1180).

Die Freisetzung von Mono-Arg-Insulin bzw. Insulin durch Einwirkung von Trypsin bzw. Carboxypeptidase B (W. Kemmler et al., *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 2780 - 2795) verläuft ausgesprochen unkompliziert, denn es erweist sich hier als besonders vorteilhaft, daß die Zahl möglicher Spaltstellen gegenüber dem normalen Proinsulin reduziert ist. Dadurch ist die Spaltung erheblich einfacher (im Hinblick auf die Bildung von Nebenprodukten wie bei der Herstellung von Des-B30-Insulin oder Desocta-B23-B30-Insulin) zu steuern. Sowohl Mono-Arg-Insulin als auch Insulin lassen sich in bekannter Weise durch Ionenaustausch-Chromatographie in hochreiner Form isolieren. Die Bildung des Insulins und des Mono-Arg-Derivates, der Verlauf der Reinigung und die Qualität des Endproduktes werden mit üblichen RP-HPLC-Verfahren (G. Seipke et al., *Angew. Chem.* 98 (1986) 530 - 548) überprüft.

Überfascenderweise kommt es bei der Spaltung von Mini-Proinsulin im Gegensatz zu natürlichem Proinsulin kaum zur Bildung von Insulin-Des-B30. Da sich letzteres nur sehr schwer von Insulin trennen lässt, wird bei der Insulingewinnung aus natürlichem Proinsulin die "Zweittopfreaktion" bevorzugt, d. h. die Hauptprodukte der tryptischen Spaltung, Insulin-Arg -Arg und Mono-Arg-Insulin, werden zunächst über Ionenaustauscher in bekannter Weise von Insulin-Des-B30 getrennt und anschließend mittels Carboxypeptidase B zu Humaninsulin gespalten (EP-B 0 195 691). Dagegen lässt sich das Mini-Proinsulin in idealer Weise in einer "Eintopfreaktion" unter gleichzeitiger Verwendung von Trypsin und Carboxypeptidase B zu Humaninsulin umwandeln.

Die Expression der Verbindung der Formel I in Hefe mit anschließender Sekretion ist besonders vorteilhaft, da das korrekt gefaltete Proinsulinderivat direkt zu isolieren ist. Als Wirtssysteme wählt man Hefen, wie sie beispielsweise in der EP-A 0 248 227 aufgeführt sind, so z. B. *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe* oder bevorzugt *Saccharomyces cerevisiae*.

Vektoren für die Expression in Hefen sind in großer Zahl bekannt. Die Herstellung des erfindungsgemäßen Insulinderivats wird im folgenden anhand des Hefe- $\alpha$ -Faktorsystems beschrieben, was jedoch nur als Beispielhaft zu verstehen ist, da in an sich bekannter Weise auch andere Expressionssysteme eingesetzt werden können.

Die Struktur des Hefe-Pheromongens MFα ist bekannt aus der Publikation Kurjan und Herskowitz, *Cell* 30 (1982) 933 - 943, wo auch die Möglichkeit der Expression anderer Gene und die Sekretion der Genprodukte diskutiert wird. Diesbezüglich kann auch auf Brake et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984), 4642 - 4646, verwiesen werden.



Nukleotideinheiten aufbauen. Dabei verfährt man wie nachfolgend beschrieben.

Das Genfragment IK I lässt sich aus 4 Oligonukleotiden mit einer Kettenlänge von 47 bis 74 Einheiten aufbauen, indem diese zunächst chemisch synthetisiert und dann über "sticky ends" von 3 Nukleotiden enzymatisch verknüpft werden. Die sticky ends entsprechen denen des Restriktionsenzymes DraIII, was für spätere Modifikationen von Vorteil ist.

Das Genfragment IK II ist aus zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden mit einer Länge von 88 und 96 Nukleotideinheiten zu erhalten.

#### 15 Beispiel 1

a) Chemische Synthese eines einzelsträngigen Oligonukleotids

Am Beispiel des Oligonukleotids Nr. 4 (Tabelle 1) wird die Synthese der DNA-Bausteine erläutert. Für die Festphasensynthese wird das am 3'-Ende stehende Nukleosid, im vorliegenden Falle also Adenin (Nukleotid Nr. 125), über die 3'-Hydroxyfunktion kovalent an einen Träger gebunden verwendet. Trägermaterial ist mit langkettingen Aminoalkylresten funktionalisiertes CPG ("Controlled Pore Glass").

In den folgenden Syntheseschritten wird die Basenkomponente als 5'-O-Dimethoxytritylnucleosid-3'-phosphorigsäure- $\beta$ -cyanoethylester-dialkylamid eingesetzt, wobei das Adenin als N<sup>6</sup>-Benzoyl-Verbindung, das Cytosin als N<sup>4</sup>-Benzoyl-Verbindung, das Guanin als N<sup>2</sup>-Isobutyryl-Verbindung und das Thymin ohne Schutzgruppe vorliegen.

25 mg des Polymeren Trägers, der 0,2  $\mu$ mol 5'-O-Dimethoxytrityl-N<sup>4</sup>-Benzoyl-2'-desoxyadenosin gebunden enthält, werden nacheinander mit folgenden Agentien behandelt:

- A) Acetonitril
- B) 3 % Trichloressigsäure in Dichlormethan
- C) Acetonitril
- D) 5  $\mu$ mol des entsprechenden Nukleosid-3'-O-phosphits und 25  $\mu$ mol Tetrazol in 0,15 ml wasserfreiem Acetonitril.

- 5 E) Acetonitril
- F) 20 % Acetanhydrid in Tetrahydrofuran mit 40 % Lutidin und 10 % Dimethylaminopyridin
- G) Acetonitril
- 10 H) 3 % Jod in Lutidin/Wasser/Tetrahydrofuran im Volumenverhältnis 5:4:1.

Unter "Phosphit" wird hierbei der 2'-Desoxyribose-3'-monophosphorigsäure-mono- $\beta$ -cyanoethylester verstanden, wobei die dritte Valenz durch einen Disopropylaminorest abgesättigt ist. Die Ausbeute der einzelnen Syntheseschritte können jeweils nach der Detritylierungsreaktion B) spektrophotometrisch durch Messung der Absorption des Dimethoxytritylkations bei der Wellenlänge von 496 nm bestimmt werden.

Nach abgeschlossener Synthese erfolgt die Abspaltung der Dimethoxytritylgruppe wie in A) bis C) beschrieben. Durch die Behandlung mit Ammoniak wird das Oligonukleotid vom Träger gespalten und zugleich werden die  $\beta$ -Cyanoethylgruppen eliminiert. Eine 16-stündige Behandlung der Oligomeren mit konzentriertem Ammoniak bei 50°C spaltet die Aminoschutzgruppen der Basen quantitativ ab. Das so erhaltene Rohprodukt wird durch Polyacrylamid-Gelektrophorese gereinigt.

In analoger Weise werden auch die Oligonukleotide 1 - 3 (Tabelle 1), 5 und 6 (Tabelle 2) hergestellt.

- 35 b) Enzymatische Verknüpfung der einzelsträngigen Oligonukleotide

Zur enzymatischen Phosphorylierung der Oligonukleotide am 5'-Terminus werden je 1  $\mu$ mol der Oligonukleotide 1 und 4 mit 5  $\mu$ mol Adenosintriphosphat mit vier Einheiten T4 Polynukleotid-Kinase in 20  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 10 mM Magnesiumchlorid und 10 mM Dithiothreitol (DTT) 30 Minuten bei 37°C behandelt. Das Enzym wird durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C deaktiviert. Die Oligonukleotide 2 und 3, welche die "überhängenden" einzelsträngigen Sequenzen bilden, werden nicht phosphoryliert. Dies verhindert bei der nachfolgenden Ligation die Ausbildung größerer Genfragmente.

Die Oligonukleotide 1 bis 4 werden wie folgt ligiert: Je 1  $\mu$ mol der Oligonukleotide 1 und 2 bzw. 3 und 4 werden paarweise hybridisiert, indem diese in jeweils 20  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 10 mM Magnesiumchlorid und 10 mM DTT gelöst werden, diese Lösung 5 Minuten auf 95°C erhitzt und binnen 2 Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Dabei werden die Oligonukleotide 1 und 4 in Form ihrer 5'-Phosphate eingesetzt. Zur weiteren Verknüpfung der gebildeten bishelikalen DNA-Fragmente werden die Lösungen derselben vereinigt, 15 Minuten auf 60°C erwärmt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Dann setzt man 2  $\mu$ l 0,1 M DTT, 16  $\mu$ l 2,5 mM Adenosintriphosphat (pH 7) sowie 1  $\mu$ l T4 DNA-Ligase (400 units) zu und inkubiert 16 Stunden bei 22°C.

Die Reinigung der so erhaltenen Genfragmente (Tabellen 1 und 2) erfolgt durch Gelelektrophorese auf einem 10 %igen Polyacrylamidgel (ohne Harnstoffzusatz, 40 x 20 x 0,1 cm), wobei als Markersubstanz  $\lambda$ X174 DNA (Fa. BRL), geschnitten mit *Hinf*I, oder pBR322, geschnitten mit *Hae*III, dient.

### Beispiel 2

35 a) Klonierung der synthetisierten DNA-Fragmente

Das handelsübliche Plasmid pUC19 wird mit den Restriktionsenzymen *Kpn*I und *Pst*I geöffnet und das große

Fragment (1), über ein 0,8 %iges "Seaplaque"-Gel abgetrennt. Dieses Fragment wird mit der synthetischen DNA (2) gemäß Tabelle 1 mit T4 DNA-Ligase umgesetzt und das Ligationsgemisch mit kompetenten *E. coli* 79/02-Zellen inkubiert. Das Transformationsgemisch wird auf IPTG/Xgal-Platten, die 20 mg/1 Ampicillin enthalten, ausplattiert. Aus den weißen Kolonien wird die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktions- und DNA-Sequenzanalyse charakterisiert. Die gewünschten Plasmide erhalten die Bezeichnung PIK1.

5 10 15 20 25 30 35

Entsprechend wird die DNA (5) nach Tabelle 2 in pUC19 ligiert, das mit *Pst*I und *Hind*III geöffnet wurde (4). Man erhält das Plasmid PIK2 (6).

b) Konstruktion des Mini-Proinsulin-Gens

Aus den Plasmiden PIK1 (3) und PIK2 (6) werden die DNA-Sequenzen (2) und (5) gemäß Tabelle 1 und 2 reisoliert und mit pUC19 ligiert, das mit *Kpn*I und *Hind*III geöffnet wurde (7). Man erhält so das Plasmid PIK3 (8), das für eine modifizierte Humaninsulinsequenz codiert.

Das Plasmid PIK3 (8) wird mit *Mlu*I und *Spe*I geöffnet und das große Fragment (9) isoliert. Dieses wird mit der DNA-Sequenz (10)

B30 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A9  
(*Thr*)(*Arg*) *Gly* *Ile* *Val* *Glu* *Gln* *Cys* (*Thr*)(*Ser*) (10)  
5' CG CGT GGT ATC GTT GAA CAA TGT TGT A 3'  
30 3' A CCA TAG CAA CTT GTT ACA ACA TGA TC 5'  
(*Mlu*I)

ligiert, die das letzte Codon der B-Kette (B30) um ein Arginin-Codon ergänzt und die herausgeschnittenen Codons für die ersten 7 Aminosäuren der A-Kette ersetzt und die Codons für die Aminosäuren 8 und 9 dieser Kette ergänzt.

35

Man erhält so das Plasmid PIK4 (11), das für das erfundungsgemäße Human-Mini-Proinsulin codiert.

c) Expressionsvektor für Mini-Proinsulin

Das aus der EP-A 0 229 998 bekannte Plasmid PK50 (12) (dort Beispiel 3; Figur 3 (33)) wird mit EcoRI und HindIII gespalten. Beide Fragmente (13) und (14) werden isoliert. Das kleine Fragment (14) mit der IL-2-Teilsequenz wird mit MluI nachgespalten und die IL-2-Teilsequenz (15) isoliert.

Das Plasmid PIK4 (11) wird mit EcoRI und HpaI gespalten und das große Fragment (16) isoliert. Dieses wird nun mit der IL-2-Teilsequenz (15) und der synthetischen DNA (17)

ligiert, wobei man das Plasmid PIK8 (18) erhält. Dieses codiert für ein Fusionsprotein, in dem auf die ersten 38 Aminosäuren des IL-2 ein Brückenglied Met-Gly-Arg und hierauf die Aminosäuresequenz des Mini-Proinsulin

folgen.

Aus dem Plasmid PIK8 (18) wird das EcoRI-HindIII-Fragment (19) herausgeschnitten, das für das genannte Fusionsprotein codiert. Dieses Fragment wird mit dem großen Fragment (13) ligiert, das bei der Spaltung von PK50 erhalten wurde. Man erhält so den Expressionsvektor PIK10 (20), der für das vorstehend charakterisierte Fusionsprotein codiert.

Beispiel 3: Expression in dem Stamm E. coli W3110

Eine Übernachtkultur aus E. coli-Zellen, die das Plasmid PIK10 (20) enthalten, wird mit LB-Medium (J. H. Miller,

Experimente in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972), das 50 µg/ml Ampicillin enthält, im Verhältnis von etwa 1:100 verdünnt und das Wachstum über OD-Messung verfolgt. Bei OD = 0,5 wird die Kultur auf 1 mM IPTG eingestellt und die Bakterien nach 150 bis 180 Minuten abzentrifugiert. Die Bakterien werden 5 Minuten in einer Puffermischung (7 M Harnstoff, 0,1 % SDS, 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,0) gekocht und Proben auf eine SDS-Gelelektrophoreseplatte aufgetragen. Nach gelelektrophoretischer Analyse wird im Bereich von ca. 10 Kd eine zusätzliche Bande beobachtet, die dem erwarteten Fusionsprotein entspricht. Diese Bande reagiert im "Western Blot"-Experiment mit gegen Insulin gerichteten Antikörpern.

Schließt man die Zellen unter Druck auf und zentrifugiert anschließend den Aufschluß ab, so wird das Fusionsprotein im Sediment neben anderen unlöslichen Zellbestandteilen gefunden.

Die angegebenen Induktionsbedingungen gelten für Schüttelkulturen; bei größeren Fermentationen ist die Wahl anderer Medien und Bedingungen, z. B. zur Erzielung veränderter O.D.-Werte, zweckmäßig.

Beispiel 4:

a) Herstellung von Mono-Arg-Insulin

40 g des durch Zentrifugation und Waschen mit Phosphatpuffer (pH 7) bzw. Wasser angereicherten Fusionsproteins (Trockensubstanzgehalt ca. 25 %) werden in 75 ml 98 - 100 %iger Phosphorsäure gelöst und mit 5 g BrCN versetzt. Nach 6-stündiger Reaktion bei Raumtemperatur wird das Gemisch mit 2 l Wasser versetzt und gefriergetrocknet.

Das Fragmentgenisch (10 g) wird in 1 l Pufferlösung (8 M Harnstoff, 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)) gelöst, auf 30°C erwärmt und mit 10 g Natriumsulfit und 2,5 g Natriumtetraphthioinat versetzt. Nach 90 Minuten bei 30°C gibt man 3 l kaltes Wasser zu und stellt den pH-Wert auf 7,0 ein. Die entstehende Flockung wird abzentrifugiert. Das Hexa-S-Sulfonat des Mini-Proinsulins wird aus dem Überstand durch pH-Einstellung auf 3,5 ausgefällt. Nach 15 Stunden Inkubation bei +4°C wird zentrifugiert. Der Niederschlag wird mit 200 ml Wasser gewaschen und gefriergetrocknet. Man erhält 4,8 g eines Substanzgemisches, in dem durch RP-HPLC ein Mino-Proinsulinanteil von 900 mg bestimmt wird. Die Anreicherung des S-Sulfonats erfolgt in 2 Stufen:

15. 1. Anionenaustausch-Chromatographie über eine 5 x 60 cm-Säule mit @Fractogel TSK DEAE-650 M in 3 M Harnstoff; 0,05 M Tris-HCl (pH 8,3). Die Elution wird mit einem Gradienten von 0,05 - 0,5 M NaCl (je 6 l) vorgenommen. Nach Analyse des Eluats durch isoelektrische Fokussierung fällt man das Produkt aus den vereinigten Fraktionen durch Verdünnung auf 1 M Harnstoff und pH-Einstellung auf 3,5 aus.
2. Entfernung von hoch- und niedermolekularen Verunreinigungen durch Gelfiltration über @Sephadryl S200 in 3 M Harnstoff; 0,05 M Tris-HCl; 0,05 M NaCl (pH 8,3). Analyse der Fraktionen und Isolierung des Produktes werden wie im vorhergehenden Schritt durchgeführt. Das Präzipitat wird mit 20 ml Wasser gewaschen und gefriergetrocknet. Man erhält 1,10 g des auf 69 % Reinheit angereicherten Produkts.
25. Zur Faltung und Disulfidbrückenbildung wird das S-Sulfonat in 50 ml 8 M Harnstoff; 0,02 M Tris-HCl bei pH 8,6 gelöst. Nach Zusatz einiger Tropfen Octanol wird 15 Minuten lang nachgereinigter Stickstoff eingeleitet. Durch Zugabe von 1,1 ml (16 mMol) 2-Mercaptoethanol erfolgt innerhalb 1 Stunde
30. bei Raumtemperatur die vollständige Reduktion. Die Lösung wird auf eine @Sephadex G25-Säule (5 x 60 cm) aufgetragen und mit 0,05 M Glycin/NaOH (pH 10,6) eluiert. Die Proteinfraktion in 300 ml des Glycinpuffers wird nach Kontrolle und eventueller Korrektur des pH-Wertes (10,6), 5. 2 Tage bei 4°C aufbewahrt. Danach wird der pH-Wert auf 6,8 eingestellt und die Lösung mit 1 mg (3,5 U) Trypsin (Merck, mit L-1-p-Tosylamino-2-phenylethyl-chlormethylketon (TPCK) behandelt) bei Raumtemperatur für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wird der pH-Wert auf 3,5 eingestellt, die Lösung mit 1 mg Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne (Sigma) und 3 ml 10 % ZnCl<sub>2</sub> versetzt und wieder auf pH 6,8 zurückgestellt. Der entstandene Niederschlag wird durch Zentrifugation abgetrennt. Er enthält überwiegend Mono-Arg-Insulin, das durch Ionenaustausch-Chromatographie an S-Sepharose® (2,5 x 40 cm) in einem Puffer aus 50 mM Milchsäure, 30 % Isopropanol (pH 3,5) gereinigt wird. Die Elution erfolgt mittels eines Gradienten von 0,05 - 0,50 M NaCl (je 1 l). Das Eluat wird durch HPLC analysiert; aus den produkthaltigen Fraktionen fällt man das Mono-Arg-Insulin nach 1:1-Verdünnung mit H<sub>2</sub>O durch Zusatz von 10 ml 10 % ZnCl<sub>2</sub> pro 1 l und pH-Einstellung auf 6,8 aus. Die durch Zentrifugation abgetrennte Fällung wird aus einem Puffer aus 1 g/l Phenol, 10,5 g/l Citronensäure und 200 mg/l ZnCl<sub>2</sub> bei pH 6 kristallisiert. Man erhält nach Gefrieretrocknung der mit etwas Wasser gewaschenen Kristalle 390 mg Mono-Arg-Insulin in über 90 % Reinheit.
35. Beispiel 5:
30. Herstellung von Insulin
- 200 mg Mono-Arg-Insulin (s. Beispiel 4) werden in 100 ml 0,05 M Tris-HCl (pH 8,5) gelöst. Dann wird 1 U (ca. 4 µg) Carboxypeptidase B zugesetzt und die Lösung bei Raumtemperatur schwach gerührt. Nach 3 Stunden wird das

Humaninsulin durch Ansäuern auf pH 3,5 und Zugabe von 1 ml 10 % ZnCl<sub>2</sub> bei pH 5,5 kristallisiert. Man erhält 200 mg kristallines Insulin mit einer Reinheit von mehr als 85 %. Dieses Material wird einer Reinigung durch

5 Ionenaustauscher-Chromatographie an einer Säule mit Fractogel TSK-DEAE-650 M (2,5 x 40 cm) in 0,1 % @Lutensol ON 100 (BASF AG; Oxyethylat eines linearen, gesättigten Fettalkohols von im wesentlichen 12 C-Atomen); 0,05 M Tris-HCl (pH 8,3) unterzogen, wobei die Elution mit einem Gradienten von 0 - 0,4 M NaCl (je 1 l) erfolgt. Aus den mittels HPLC identifizierten produktthaligen Fraktionen wird das Insulin nach Zusatz von 10 ml 10 % ZnCl<sub>2</sub> und 1 ml 10 % Citronensäure bei pH 5,5 kristallisiert. Nach langsamem Rühren über Nacht wird zentrifugiert und das erhaltene Sediment aus 20 ml eines Puffers aus 5 g/l Citronensäure, 125 ml/1 Aceton und 200 mg/1 ZnCl<sub>2</sub> bei pH 5,5 umkristallisiert. Man erhält 160 mg Insulin mit einer Reinheit von mehr als 95 %.

20 Beispiel 6:

Herstellung von Insulin aus Mono-Arg-Insulin durch kombinierten Einsatz von Trypsin und Carboxypeptidase B

25 5 mg Mono-Arg-Insulin werden in 20 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) gelöst und auf 30°C erwärmt. Es werden gleichzeitig 2,5 µl Trypsinlösung (1 U/ml) und 150 µl Carboxypeptidase B-Lösung (1 U/ml) zugegeben. Nach 3 Stunden wird die Lösung auf pH 3,5 eingestellt und 2,5 µl Trypsininhibitorlösung (1 U/ml) sowie 200 µl 10 %ige ZnCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben. Das Humaninsulin wird durch Einstellen auf pH 6,8 ausgefällt, abzentrifugiert und wie in Beispiel 5 kristallisiert. Das kristallisierte Insulin hat eine Reinheit > 95 %.

35 Beispiel 7: Konstruktion eines Hefe-Expressionsvektors

Zunächst wird die DNA-Sequenz (21) (Tabelle 3) nach dem Phosphitverfahren synthetisiert. Diese DNA-Sequenz (21)

codiert für die Aminosäuren 49 bis 80 des MFα-Vorläuferproteins und entspricht im wesentlichen der natürlichen DNA-Sequenz.

5 Die DNA-Sequenz (21) wird zunächst als Sonde zur Isolierung des Gens für den α-Faktor verwendet und hierzu mit <sup>32</sup>P markiert. Mit Hilfe dieser Sonde wird aus einer genomischen λgt11-Refogenbank (wie sie inzwischen handelsüblich und z. B. bei Clontech Laboratories Inc., 4055 Fabian Way, Palo Alto, CA94303 erhältlich sind) isoliert. Dazu werden λgt11-Phagen, die das α-Faktorogen tragen, in einem Plaque-Hybridisierungsexperiment identifiziert. Phagen aus als positiv identifizierten Plaques werden isoliert, vermehrt und die DNA gewonnen. Diese wird mit EcoRI gespalten und auf einem 0,8 %-igen Agarosegel analysiert. Nach einem "Southern transfer"-Experiment wird die Membran gegen die <sup>32</sup>P-markierte DNA-Sequenz (21) hybridisiert. Phagen-DNA, die ein ca. 1,75 kb-Fragment (22) aufweist, das gegen die DNA-Sequenz (21) hybridisiert, wird erneut mit dem Enzym gespalten und das entsprechende Fragment (22) isoliert. Der Vektor pUC 19 wird mit EcoRI geöffnet (23) und mit dem 1,75 kb-Fragment (22) mit T4-Ligase umgesetzt. Man erhält den Klonierungsvektor (24).

10

15

20

25

30

35

Mit dem Ligationsgemisch wird der Stamm E. coli 79/02 transformiert. Weiße Kolonien werden isoliert, hieraus die Plasmid-DNA gewonnen und Plasmide (24), die das 1,75 kb-EcoRI-Fragment enthalten, identifiziert.

Die natürliche DNA-Sequenz des Vorläuferproteins für MFα enthält im Bereich der Aminosäuren 8 bis 10 eine PstI-Schnittstelle und im Bereich der Aminosäuren 48/49 eine TaqI-Schnittstelle. Aus der isolierten Plasmid-DNA (24) wird nun durch Umsetzung mit PstI und TaqI das Fragment (25) isoliert, das für die Aminosäuren 9 bis 48 der MFα-Vorläufersequenz codiert. Der Vektor pUC18 wird mit PstI und KpnI geöffnet (26) und mit dem PstI-TaqI-Fragment (25) sowie mit der synthetischen DNA-Sequenz (21) mit Hilfe

von T4-Ligase umgesetzt. Mit dem Ligationsgemisch wird E. coli 79/02 transformiert. Das Transformationsgemisch wird auf IPTG-Xgal-Ap-Platten auspattiert. Weiße Kolonien werden isoliert und die Plasmid-DNA dieser Klonen durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Man erhält so den Klonierungsvektor (27), der für die Aminosäuren 8 bis 80 der MFa-Vorläufersequenz codiert.

Aus dem Klonierungsvektor (27) wird durch Umsetzung mit PstI und Kpnl die genannte codierende Sequenz (28) ausgeschnitten und in die im folgenden beschriebene

Ligierung eingebracht. Hierzu wird der Klonierungsvektor (24) mit EcoRI und partial mit PstI umgesetzt und das die Codierungssequenz für die ersten 8 Aminosäuren der MFa-Vorläufersequenz umfassende Fragment (29) isoliert. Weiterhin wird der Vektor pUC19 mit EcoRI und KpnI geöffnet (30) und mit den beiden beschriebenen Fragmenten (28) und (29) ligiert, wobei der Klonierungsvektor (31) entsteht. Dieser codiert für die gesamte Vorläufersequenz des MFa bis zur Aminosäure 80.

Der Klonierungsvektor (31) wird mit KpnI und HindIII geöffnet und das große Fragment (32) isoliert. Dieses wird mit dem KpnI-HindIII-Fragment (33) aus dem Plasmid (11), das für das Mini-Proinsulin codiert, ligiert. Man erhält so das Plasmid pIK20 (34), dessen Struktur durch Restriktionsanalyse bestätigt wird.

Das Plasmid Yep13 (Broach et al., Gene 8 (1979) 121) wird mit BamHI geöffnet und die überstehenden Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt (36). Die DNA wird mit Ethanol gefällt und mit alkalischer Rinderphosphatase behandelt.

Aus dem Klonierungsvektor (34) wird mit HindIII und EcoRI das für das Insulin-Derivat und die Vorläufersequenz des MFa codierende Fragment ausgeschnitten und die überstehenden Enden wie beschrieben aufgefüllt (35).

Die beiden stumpfendigen DNA-Sequenzen (35) und (36) werden miteinander ligiert, wobei die Plasmide pafB102 und pafB104 entstehen. Diese beiden Plasmide unterscheiden sich nur in der Orientierung des insertierten Fragmentes.

5 Wie in der EP-A 0 171 024 beschrieben, kann hinter die insertierte Sequenz ein Terminator eingesetzt werden (Figuren 4 bis 6 der EP-A 0 171 024). Hierfür eignen sich die NcoI- und/oder die BamHI-Schnittstellen.

10 Nach Amplifikation der Plasmid-DNA in E. coli MM294 wird das Plasmid pafB102 in die Leucin-bedürftigen Hefestämme Y79 ( $\alpha$ , trp1-1, leu2-1) (Cantrell et al., Proc. Acad. Natl. Sci. USA 82 (1985) 6250) und DM6-6 ( $\alpha$ / $\alpha$  leu2-3, ura3<sup>+</sup>/leu2-1, lys2<sup>+</sup>, trp1-/trp1<sup>-</sup>, his3-11, 15/his3-11, 15, ura3<sup>+</sup>/ura3<sup>-</sup>, lys2<sup>-</sup>/lys2<sup>-</sup>, arg4-17/arg4<sup>+</sup>, adel<sup>-</sup>/adel<sup>+</sup>) (Maya Hanna, Dept. Mol. Biol. Massachusetts General Hospital, Boston, USA) nach der Lithium-Methode von Ito, H. et al., J. Bacteriol., 153 (1983) 163 transformiert. Kolonien, die auf selektivem Medium ohne Leucin-Zusatz wachsen können, werden isoliert und vereinzelt. Hefe-Minimalmedium wird mit den einzelnen Kolonien beimpft und 24 Stunden bei 28°C inkubiert. Die Zellen werden abzentrifugiert und der Überstand in einem RIA-Test auf Insulinaktivität überprüft.

15 Aus Hefeklonen, deren Überstand Insulinaktivität zeigt, wird die Plasmid-DNA reisoliert und durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Die transformierten Hefestämme werden für die folgende Expression eingesetzt.

20 Beispiel 8: Expression in Hefe

25 10 ml Hefevollmedium wird mit Zellen, die aus einer frischen Übernachtkultur eines nach Beispiel 7 erhaltenen Stammes aus selektivem Medium entnommen wurden, so beimpft, daß eine optische Dichte OD<sub>600</sub> = 0,1 erreicht wird. Die Kultur wird 8 Stunden bei 28°C geschüttelt, worauf 90 ml frisches Medium zugesetzt werden. Anschließend wird die Kultur für weitere

30 35

20 Stunden geschüttelt. Die Zellen werden abzentrifugiert und die Insulinkonzentration im Überstand bestimmt. Die Bedingungen ändern sich für größere Fermentation, z. B. kann frisches Medium kontinuierlich zugesetzt werden.

5 Beispiel 9: Reinigung von Mono-Arg-Insulin aus Hefeüberstand

Der Fermentationsüberstand wird über eine Adsorptionsäule mit einem porösen Adsorberharz aus einem Copolymer von Styrol und Divinylbenzol (Diaion HP20) gegeben. Die Säule wurde zuvor mit einem 20 - 50 mM Acetatpuffer (pH 5) äquilibriert. Nach Waschen mit Tris-Puffer (pH 8) wird ein Isopropanolgradient (0 - 50 %) mit dem 10-fachen Säulenvolumen angelegt. Insulinhaltige Fraktionen werden auf pH 6 eingestellt, mit ONATEX CELLUFINE AM (Fa. Amicon) versetzt, gerührt und abgenutscht und mit 50 mM Acetatpuffer (pH 6) nachgewaschen. Die Waschfraktion und die Hauptfraktion werden vereinigt, mit Milchsäure auf pH 3,5 eingestellt und über eine S-SEPHAROSE-Säule, die mit 50 mM Milchsäure (pH 5)/30 % Isopropanol äquilibriert wurde, gegeben.

Die Elution erfolgt mittels eines 0 - 0,6 M NaCl-Gradienten. 25 Mini-Proinsulin eluiert im Bereich 0,25 - 0,3 M.

Die proinsulinhaltigen Fraktionen werden auf 1/4 des Volumens eingeengt und über eine Säule mit Biogel-P10 (Bio-Rad), äquilibriert in 6 % Essigsäure (pH 2), gegeben. Das insulinhaltige Eluat wird lyophilisiert und über einen präparativen "reversed phase"-HPLC-Schritt (RP18-Material, 0,1 % TFA, Acetonitrilgradient 20 - 40 %) gereinigt. Nach anschließender Gefrier trocknung wird in Tris-Puffer (pH 6,8) gelöst und mit 4 Einheiten Trypsin pro Gramm Mono-Arg-Proinsulin bei Raumtemperatur 3 bis 5 Stunden inkubiert. Der Reaktionsverlauf wird über "reversed-phase"-Analytik kontrolliert. Es zeigt sich, daß nahezu quantitativ Mono-

Arg-Insulin entsteht. Am Ende der Reaktion wird ein pH-Wert von 3,5 eingestellt und die Reaktion durch Zugabe einer äquivalenten Menge Trypsininhinitor beendet. Anschließend wird eine Zinkchloridkonzentration von 0,21 g/l und ein pH-Wert von 6,8 eingestellt. Man erhält einen flockigen Niederschlag, der in Milchsäurepuffer gelöst wird. Die Komponenten werden über S-SEPHAROSE-Chromatographie voneinander getrennt. Fraktionen, die Mono-Arg-Insulin enthalten, werden vereinigt und mit Wasser im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend wird die Lösung mit 10 ml 10 % ZnCl<sub>2</sub> pro 1 l versetzt. Bei pH 6,8 fällt dann Mono-Arg-Insulin aus, das dann in (für Insulin) bekannter Weise umkristallisiert wird.

5 Beispiel 10: Herstellung von Humaninsulin

Das nach Beispiel 9 dargestellte Mono-Arg-Insulin dient als Ausgangssubstanz für die Carboxypeptidase B-Spaltung. Dazu wird das Insulinderivat in Tris-Puffer (pH 8,5) gelöst und mit 5 Einheiten Carboxypeptidase B pro Gramm Mono-Arg-Insulin versetzt. Unter schwachem Rühren bei Raumtemperatur wird die Reaktion über 3 Stunden durchgeführt. Dann wird wie in Beispiel 9 beschrieben mit ZnCl<sub>2</sub> gefällt. Humaninsulin wird dann in bekannter Weise gereinigt (DE-B 2 629 568).

Tabelle 1

	100	110	120
TAC ACT CCA AAG ACG CGT AAG GGT TCT C			
ATG TGA GGT TTC GCA TTC CCA AGA G			

Tabelle 2

130	140	150	160
<----- 6 ----->			
G AAG CGT CGT ATC GTT GAA CAA TGT ACT AGT ATC TGT TCT			
AC GTC TTC GCA CCA TAG CAA CTT GTT ACA ACA TGA TCA TAG ACA AGA			
<----- 5 ----->			
SpeI			

> TTG TAC CAG CTG GAA AAC TAC TGT AAC TGA TAG TCG ACC CAT GGA  
AAC ATG GTC GAC CTT TTG ATG ACA TTG ACT ATC AGC TGG GTA CCT TCG A

(PstI) MluI

Tabelle 3: DNA-Sequenz (21)

## Patentansprüche

## 1. Verbindung der Formel 1

5' C GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTC TCC  
3' TA CAA CGA CAA AAC GGT AAG AGG

AAC AGT ACT AAT AAC CGT TTA TTG TTC  
TTG TCA TGA TTA TTG CCA AAT AAC AAG

75	80
GCT AAA GAA GAA	GTC CTC CCC
CGA TTT CTT CTT	CGA CTC CCC

## 1. Verbindung der Formel

5 B(1-30)-Arg-A(1-21) (I),  
in der B(1-30) und A(1-21) die B- bzw. A-Kette des  
Humaninsuling bedant

## 10 2. Verbindung der Formel I zur Verwendung als Heilmittel, insbesondere zur Behandlung des Diabetes mellitus.

3. Arzneimittel, enthaltend die Verbindung der Formel I.  
 4. Arzneimittel aus einem pharmakologisch unbedeutlichen

## Träger und der Verbindung der Formel I.

## 5. Verwendung der Verbindung der Formel I zur Herstellung der Verbindung der Formel II

$$S - S \\ A(1 - 21) \\ S - S \\ S - S \\ B(1 - 30) \\ B(1 - 30)$$

in der A(1-21) und B(1-30) die in Anspruch 1 genannte Bedeutung haben und die -S-S-Brücken wie im Insulin angeordnet sind, oder von Insulin, vorzugsweise in einer Eintopfreaktion.

6. Verfahren zur Herstellung der Verbindung der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß man ein für diese Verbindungen codierendes Gen in einer Wirtzelle, vorzugsweise in einem Bakterium oder in einer Hefe exprimiert.

7. DNA, codierend für die Verbindungen der Formel 1:

8. Genstruktur oder Plasmid, enthaltend die DNA nach Anspruch 7.

9. Wirtszelle, vorzugsweise ein Bakterium oder eine Hefe enthaltend die Genstruktur oder ein Plasmid nach Anspruch 8.

10. Fusionsprotein, enthaltend die Verbindung der Formel I, vorzugsweise über ein Brückenglied

- Met - Gly - Arg -

an den "Ballastanteil" des Fusionsproteins gebunden.

## Mini-Projekt 1: seine Herstellung und Verwendung

Ein Mini-Proinsulin, bei dem anstelle der C-Kette die Aminosäure Arg die A- und die B-Kette überbrückt, zeigt Insulinaktivität und eignet sich zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung des Diabetes mellitus. Es kann weiterhin einfach mit Trypsin in ein Insulinderivat überführt werden, dessen B-Kette um Arg verlängert ist. Dieses kann mit Carboxypeptidase B in Insulin umgewandelt werden. Vorteilhaft kann aber auch das Mini-Proinsulin direkt in einem Eintopfverfahren zu Insulin umgesetzt werden.

17369686

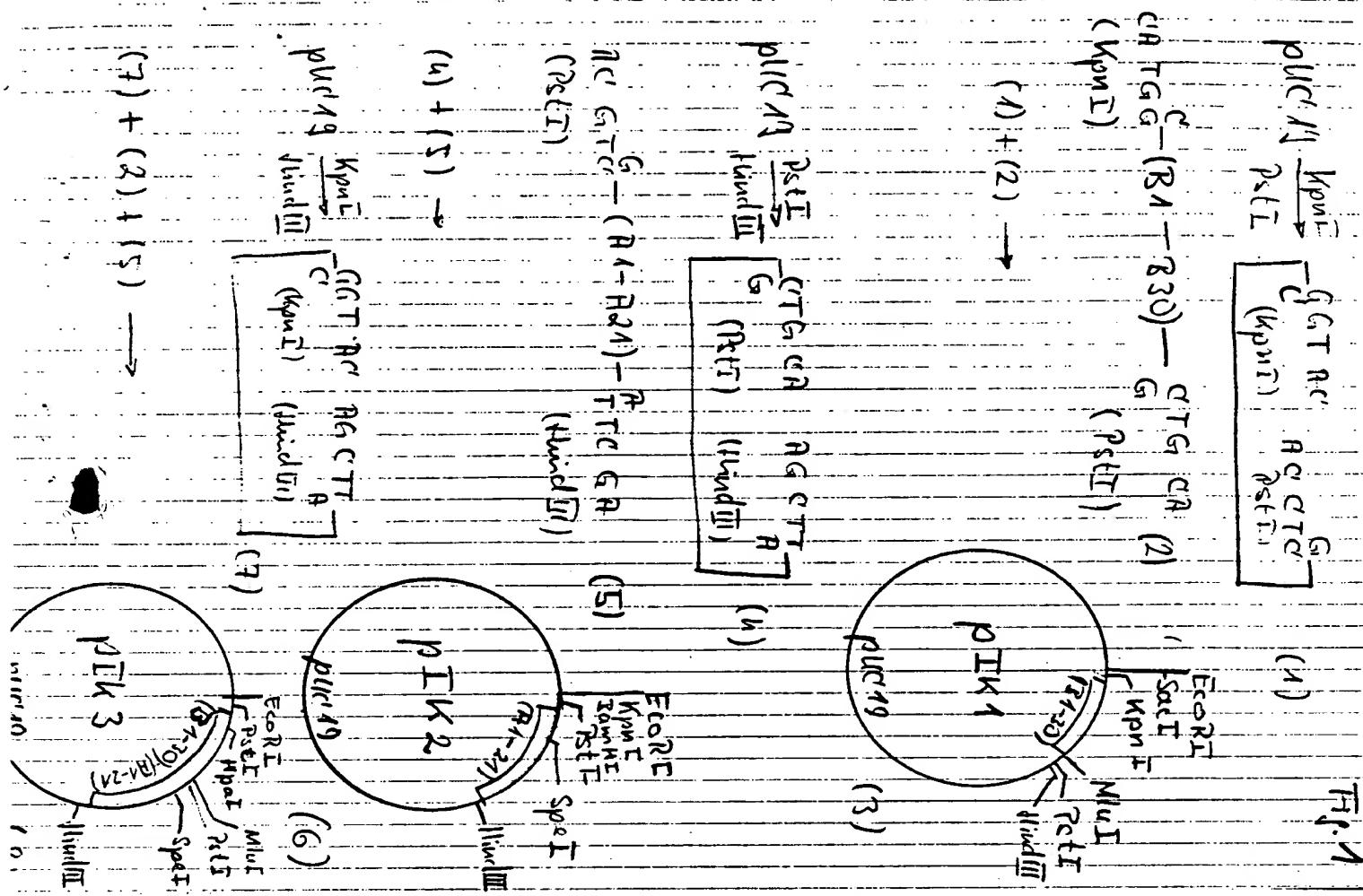
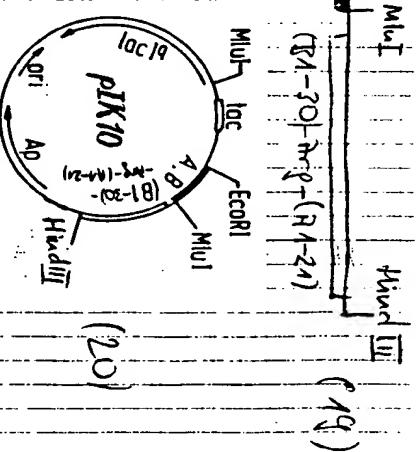
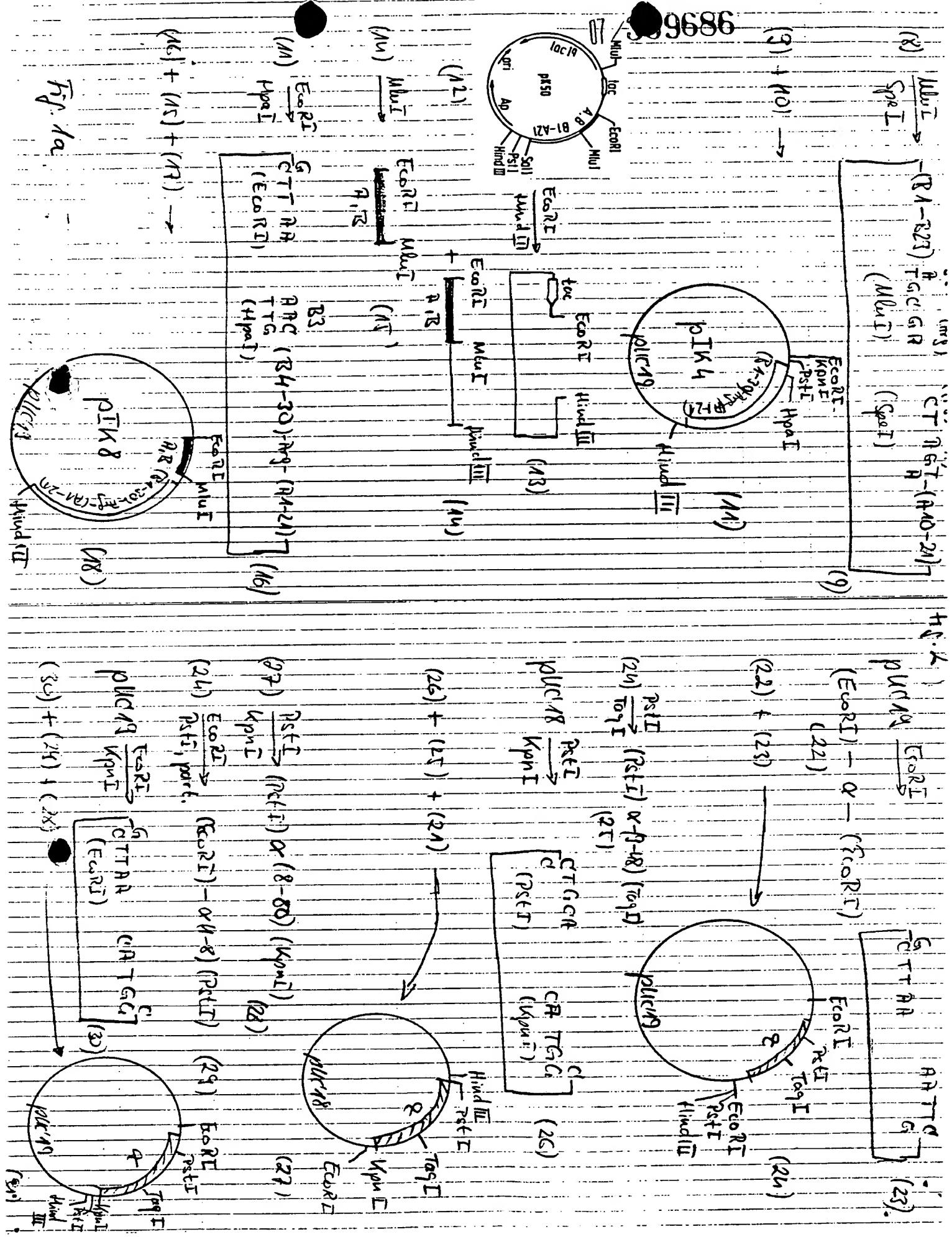


Fig. 16





07/369686

79. 26

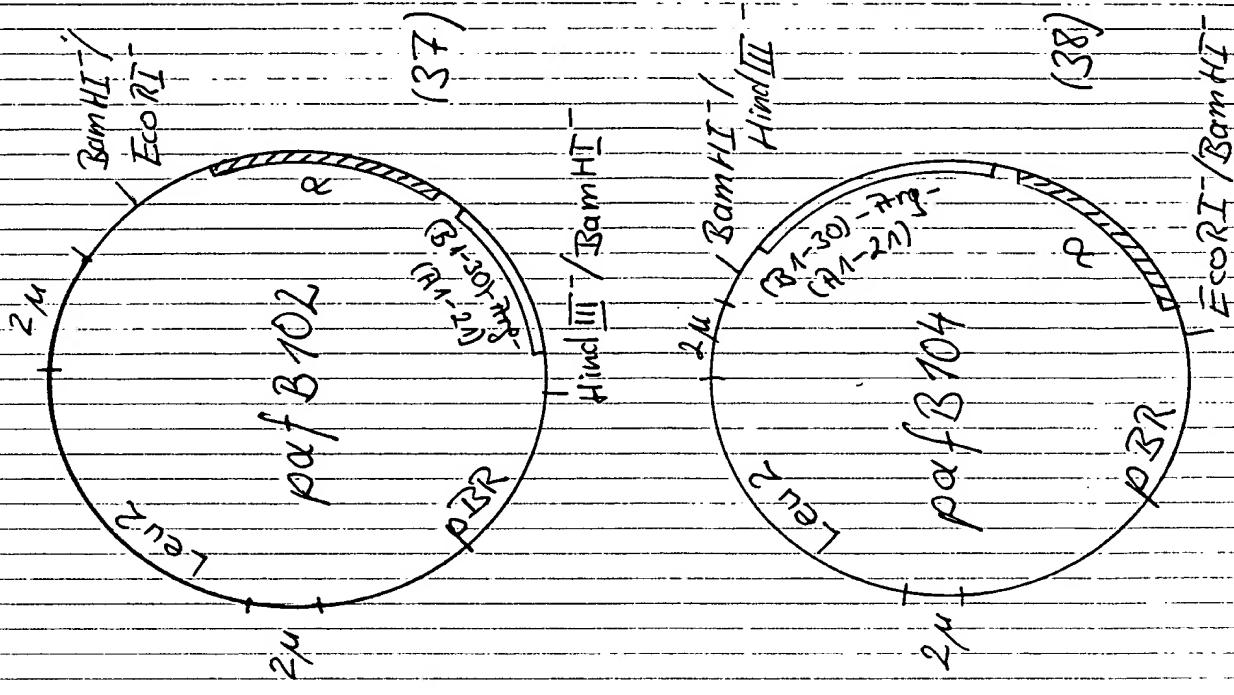


Fig. 2a  
Ecoregion C (Hindmarsh)

(32)

Anti Taeg

Upright Wind

$$\frac{1}{(11)} \xrightarrow{\text{I} \text{ and } \text{II}} \frac{1}{(11)} \xrightarrow{\text{III}} \frac{1}{(11)} = \frac{1}{555227}$$

$$(32) + (33)$$

P1K20  
R1-34729  
2010  
PULCA

三

$$- \pi \sin \theta \left( \partial \theta / \partial x \right) - \pi \sin \theta \left( \partial \theta / \partial y \right) - \pi \sin \theta \left( \partial \theta / \partial z \right)$$

Yea 13 James (Kleinert)

جاءت اتفاقاً (36)

$$(25) + (31) \rightarrow (38)$$

110

1000

111

ESCORI Ram 47